

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/00, A01K 67/027		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/06834 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Februar 1998 (19.02.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04352		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 9. August 1997 (09.08.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 32 532.3 13. August 1996 (13.08.96) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH (DE/DE); Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WAGNER, Erwin [AT/AT]; Blütenasse 9/25, A-1030 Wien (AT). WANG, Zhao-Qi [CN/FR]; 23, rue Crillon, F-69006 Lyon (FR).			
(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM GMBH; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).			

(54) Title: PROCESS FOR DEVELOPING MAMMALS WITH DEFINITE GENETIC FEATURES

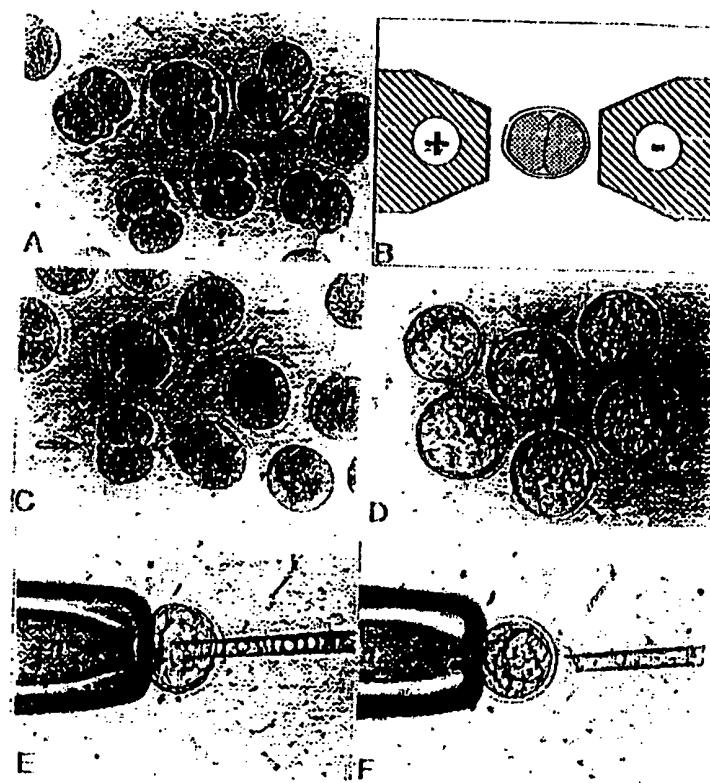
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON SÄUGETIEREN MIT DEFINIERTEN GENETISCHEN EIGENSCHAFTEN

(57) Abstract

The invention pertains to a process for developing mammals with definite genetic features, including transgenic mammals. In order to obtain in one single step animals entirely derived from ES cells (embryonic stem cells), *in vitro* genetically engineered and cultured totipotent cells (embryonic stem cells or embryonic germ cells) are injected into tetraploid blastocysts, and the resulting embryo is implanted into a surrogate mother.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Säugetieren mit definierten genetischen Eigenschaften, insbesondere transgenen Säugetieren. Durch Injektion von *in vitro* genetisch manipulierten und gezüchteten totipotenten Zellen (embryonische Stammzellen oder embryonische Keimzellen) in tetraploide Blastozysten und Einführung des erhaltenen Embryos in eine Ammenmutter werden in einem Arbeitsschritt Tiere erhalten, die vollständig von ES-Zellen abgeleitet sind.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	IS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON SÄUGETIEREN MIT DEFINIERTEN GENETISCHEN EIGENSCHAFTEN

Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung von Säugetieren mit definierten genetischen Eigenschaften, insbesondere auf die Herstellung transgener Tiere.

Transgene Tiere sind Organismen, in deren Keimbahn permanente genetische Veränderungen eingeführt wurden; ein neu eingeführtes Gen wird als Transgen bezeichnet. Transgene Tiere stellen für die moderne Biologie ein unverzichtbares Werkzeug dar, die gewebsspezifische Regulation von Genen und deren Funktion bei der Entwicklung und bei Erkrankungen zu analysieren. Die transgene Technologie bietet ferner die Möglichkeit, Tiermodelle für Erkrankungen des Menschen zur Verfügung zu stellen sowie große Mengen von Proteinen in Farm-Tieren zu produzieren.

Bei der bisher am häufigsten verwendeten Technik zur Herstellung transgener Tiere wird rekombinante DNA in die befruchteten Eier mikroinjiziert; eine weitere Technik, um Gene in Tierembryonen einzuführen, benutzt Viren, meist rekombinante retrovirale Vektoren (siehe den Übersichtsartikel von Wagner und Keller, 1992).

Die dritte und jüngste Technik, um fremdes genetisches Material in Tiere einzuführen, macht sich das Potential embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) zunutze, chimäre Tiere auszubilden. Säugetierembryonen haben die Fähigkeit, während ihrer Entwicklung fremde Zellen einzubauen zu können. Zwei verschiedene Prä-Implantations-Embryonen, für gewöhnlich Morulae, werden *in vitro* aggregiert; dies ergibt einen chimären Embryo,

der eine Mischung beider Embryonen darstellt. Diese Embryonen werden anschließend in eine scheinträchtige Maus, die als Ammenmutter fungiert, übertragen; die erhaltenen Chimären Nachkommen weisen in ihren Geweben einen unterschiedlichen Anteil von Zellen auf, die jeweils aus einem der beiden ursprünglichen Embryonen stammen. Die Kombination dieser Methode mit der Verwendung von ES-Zellen erwies sich als sehr wirksam für die Herstellung genetisch manipulierter Tiere.

Embryonale Stammzellen leiten sich von der inneren Zellmasse ("inner cell mass", ICM) von Blastozysten ab; sie sind totipotente Zellen, die sich zu sämtlichen Zell-Abstammungsreihen (cell lineages), einschließlich Keimzellen entwickeln können, wenn sie durch Injektion in diploide Blastozysten oder durch Aggregation mit Morulae in einen Embryo eingeführt werden (Robertson, 1987; Bradley, 1987; Beddington and Robertson, 1989; Nagy et al., 1990). ES-Zellen können aus Blastozysten isoliert und anschließend als permanente Zelllinien etabliert werden, wenn sie unter gut definierten, genau einzuhaltenden Kulturbedingungen gezüchtet werden; sie können genetisch manipuliert werden. Aufgrund dieser Fähigkeit stellen sie ein wirksames Werkzeug zur Modifikation des Säugetier-, insbesondere des Mausgenoms dar, indem z.B. mit ihrer Hilfe gezielte Mutationen oder andere genetische Veränderungen in die Tiere eingeführt werden (Wagner et al., 1991; Ramirez-Solis et al., 1993; Skarnes, 1993; Bronson and Smithies, 1994).

Seit einiger Zeit stehen Zellen der Bezeichnung "embryonale Keimzellen" ("Embryonic germ cells"; "EG Zellen") zur Verfügung, die aus primordialen Keimzellen zu immortalisierten Zelllinien gezüchtet werden können und ES-Zellen in vieler Hinsicht ähnlich

sind, u.a. sind EG-Zellen totipotent, können wie ES-Zellen manipuliert werden und bilden Keimbahn-Chimäre aus, wenn sie in Blastozysten eingeführt werden (Donovan et al., 1997).

Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene experimentelle Techniken entwickelt, um Tiere herzustellen, die von totipotenten Zellen abgeleitet sind. (Totipotente Zellen sind Zellen mit der Fähigkeit, sich zu sämtlichen somatischen Zellen sowie zu Keimzellen zu differenzieren.) Diese Methoden hatten im Fall von ES-Zellen, vorrangig zum Ziel, das gesamte Entwicklungspotential von ES-Zellen *in vitro* zu erhalten (Williams et al., 1988; Smith et al., 1988) und das Entwicklungspotential der Wirtszellen bei der Bildung von Chimären zu beschränken und somit die Häufigkeit der Bildung von Keimbahn-Chimären zu erhöhen (Nagy et al., 1990; Kaufman und Webb, 1990). Einer der wichtigsten Fortschritte bei der Entwicklung dieser Techniken ist die Verwendung von tetraploiden Embryonen als Wirtszellen, weil tetraploide Zellen nach der Implantation nur ein beschränktes Potential zur Entwicklung aufweisen (Nagy et al., 1990; Kaufmann und Webb, 1990; Kubiak und Tarkowski, 1985). Wenn tetraploide mit diploiden Embryonen aggregiert werden, ist die Differenzierung der tetraploiden Zellen weitgehend auf das primitive Endoderm und das Trophectoderm beschränkt, welche in der Folge extraembryonale Gewebe bilden, während die diploiden Zellen den eigentlichen Embryo ausbilden können (James und West, 1994; James et al., 1995).

In einer früheren Arbeit wurden verschiedene ES-Zelllinien mit Morulae aggregiert, um auf diese Weise Fötten herzustellen, die vollständig von ES-Zellen abstammen (vollständig von ES-Zellen abstammende

Organismen werden im folgenden als "ES-Tiere", z.B. "ES-Mäuse", bzw. ES-Föten" bezeichnet); die erhaltenen ES-Föten starben jedoch bei der Geburt (Nagy, 1990). Weitere Studien zeigten, daß lebensfähige und fruchtbare, ausschließlich von ES-Zellen abstammende ES-Mäuse erhalten werden können, wenn Wildtyp-R1-Zellen einer frühen Passage (Nagy et al., 1993) oder TT2-Zelllinien (Ueda et al., 1995) für die Aggregation mit tetraploiden Morulae verwendet werden.

ES-Mäuse wurden ferner hergestellt, indem in einem ersten Schritt ES-Zellen in diploide Blastozysten injiziert wurden, womit zunächst chimäre Mäuse erhalten wurden; weitere Kreuzungen ergaben nach zwei Generationen ES-Mäuse. Die Methode der Injektion in Blastozysten wurde zunächst von Gardner, 1968, eine vereinfachte Version von Bradley und Robertson, 1986, sowie von Bradley, 1987, beschrieben.

Das Ziel, durch Verwendung von ES-Zellen aus späteren Passagen lebensfähige ES-Mäuse zu erhalten, wurde mit den bisher verfügbaren Methoden nicht erreicht (Nagy et al., 1993); die Herstellung von ES-Mäusen unter Verwendung von genetisch modifizierten ES-Zellen schien überhaupt nicht möglich. (Die Verwendbarkeit von ES-Zellen aus späteren Passagen ist vor allem im Hinblick auf die Verwendung von Zelllinien von Bedeutung, ferner im Hinblick auf Verwendung genetisch veränderter ES-Zellen, deren Selektion naturgemäß mit einer Erhöhung der Passagenanzahl einhergeht.)

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein neues Verfahren bereitzustellen, mit dem Säugetiere mit definierten genetischen Eigenschaften, insbesondere transgene Säugetiere, erhalten werden können, die vollständig von totipotenten Zellen abgeleitet sind.

Die gestellte Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Herstellung von Säugetieren mit definierten genetischen Eigenschaften, insbesondere transgenen Säugetieren, gelöst, bei dem totipotente Zellen derselben Säugetierspezies in Blastozysten eingeführt werden und der erhaltene Embryo in eine Ammenmutter transferiert wird. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß totipotente Zellen mit definierten genetischen Eigenschaften in tetraploide Blastozysten eingeführt werden.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können Tiere erhalten werden, die vollständig von totipotenten Zellen abgeleitet sind. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet den Vorteil, in einem einzigen Schritt aus *in vitro* gezüchteten totipotenten Zellen (ES-Zellen oder EG-Zellen) vollständig von totipotenten Zellen abgeleitete Tiere zu erhalten.

Unter den Begriff "transgene Säugetiere" fallen im Rahmen der vorliegenden Erfindung definitionsgemäß Tiere, die eine permanente genetische Veränderung beliebiger Art tragen.

Tiere, die "vollständig von totipotenten Zellen abgeleitet" sind, enthalten vorzugsweise zu 100% Zellen, die von ES-Zellen oder EG-Zellen stammen. Die Tiere können jedoch einen geringen Anteil, vorzugsweise nicht mehr als 10%, an Zellen aufweisen, die von den tetraploiden Blastozysten abgeleitet sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Säugetiere Mäuse; das Verfahren kann jedoch grundsätzlich auf sämtliche Säugetiere Anwendung finden, von denen ES-Zellen oder EG-Zellen erhalten

werden können. Voraussetzung dafür, totipotente Zellen von anderen Säugetieren als Mäusen zu erhalten, ist die Definition von Bedingungen, die die Züchtung von ES-Zellen oder primordialen Keimzellen aus diesen Organismen und die Etablierung von ES- bzw. EG-Zelllinien erlauben, u.a. das Erfordernis von spezifischen Wachstumsfaktoren sowie von Feeder-Zellen für die Co-Kultivierung mit den ES-Zellen oder EG-Zellen. Diese Bedingungen können mit Hilfe von Serienversuchen empirisch ermittelt werden.

Die Isolierung von ES-Zellen aus Blastozysten, die Etablierung von ES-Zelllinien und deren anschließende Züchtung werden nach herkömmlichen Methoden vorgenommen, wie z.B. von Doetchmann et al., 1985; Li et al., 1992; Robertson, 1987; Bradley, 1987; Wurst und Joyner, 1993; Hogan et al., 1994; Wang et al., 1992, beschrieben. Die Züchtung von EG-Zellen kann nach Methoden, beschrieben im Übersichtsartikel von Donovan et al., 1997, sowie in der dort zitierten Originalliteratur, erfolgen. Totipotente Zelllinien, z.B. Maus-ES-Zelllinien, können in Vorversuchen darauf getestet werden, ob sie aufgrund ihres Entwicklungspotentials für die Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind. Dazu können Zellen der interessierenden Linien in diploide Maus-Embryonen injiziert, die erhaltenen Embryonen in Ammenmütter eingebracht und die Jungen auf Chimärismusrate sowie auf Häufigkeit der Ausbildung von Keimbahnchimären untersucht werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die totipotenten Zellen ES-Zellen.

Tetraploide Blastozysten können nach bekannten Methoden durch Elektrofusion von Zwei-Zell-Embryonen erhalten

und anschließend gezüchtet werden, wie z.B. von James et al., 1992; Nagy und Rossant, 1993; oder von Kubiak und Tarkowski, 1985 beschrieben.

Die Einführung der ES-Zellen oder EG-Zellen in die Blastozysten wird ebenfalls in an sich bekannter Weise vorgenommen. Bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die Methode der Mikroinjektion, wie z.B. von Wang et al., 1991, beschrieben. Bei der herkömmlichen Mikroinjektion werden in einer Mikromanipulationsapparatur ca. 5-10 ES-Zellen, die einer Einzel-Zellsuspension entnommen wurden, in eine Blastozyste, die mittels Haltepipette immobilisiert wurde, injiziert. Dann werden die Embryonen mindestens 3 h lang, gegebenenfalls über Nacht, inkubiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden genetisch manipulierte totipotente Zellen verwendet, um transgene Tiere zu erhalten.

Bezüglich der Art der genetischen Veränderung der totipotenten Zellen gibt es keinerlei Beschränkungen: Es können Gene überexprimiert, mutiert oder, im Hinblick auf die Herstellung von sog. "Knock-Out"-Tieren, ausgeschaltet werden; ferner können Fremdgene inseriert oder intrachromosomal Deletionen vorgenommen werden. Die genetische Veränderung kann auf einem oder auf beiden Allelen vorgenommen werden, letzterer Ansatz wurde z.B. von Hilberg und Wagner, 1992, für die Ausschaltung des c-jun-Gens beschrieben. Daß die vorliegende Erfindung eine genetische Veränderung auf beiden Allelen ermöglicht, ist ein besonderer Vorteil; mit den Methoden des Standes der Technik war es nur möglich, nach weiteren Kreuzungen und langwieriger Züchtung von Tieren, die eine genetische Veränderung auf einem Allel aufwiesen, transgene Tiere zu erhalten,

in denen beide Allele die gewünschte Veränderung trugen.

Für die genetische Manipulation der totipotenten Zellen können herkömmliche Methoden verwendet werden. Im allgemeinen werden Plasmide, vorzugsweise linearisierte Plasmide, verwendet, die die gewünschte genetische Veränderung tragen. Im Hinblick auf die Selektionierbarkeit der genetisch veränderten ES-Zellen enthalten die Plasmide zweckmäßig ein Marker-Gen, z.B. das Neomycin-, Hygromycin- oder Puromycinresistenzgen, unter Kontrolle eines Promotors. Im Hinblick auf die Expression eines auf dem Plasmid enthaltenen Gens in den Wirtszellen kann das Plasmid Genexpressionskontrollsequenzen, z.B. einen in ES-Zellen bzw. EG-Zellen funktionellen, starken Promotor, wie den PGK(Phosphoglycerinkinase)-Promotor, enthalten.

Die Methoden, mit denen das Plasmid in die Zellen eingeführt wird, sind literaturbekannte Standardmethoden für den *in vitro* Transfer von DNA in Säugetierzellen, z.B. Elektroporation, Calciumphosphat-Präzipitation, oder Methoden auf der Grundlage der Rezeptor-vermittelten Endozytose, geoffenbart z.B. in der WO 93/07283.

Eine weitere Methode zur Einführung genetischer Veränderungen in den totipotenten Zellen benutzt Viren, z.B. rekombinante retrovirale Vektoren; bzgl. auf dem Vektor enthaltenen Sequenzabschnitten, die die Selektion genetisch veränderter Zellen bzw. die Expression in der Zelle ermöglichen, gilt grundsätzlich das zu den Plasmiden Gesagte (Wagner und Keller, 1992; Stewart et al., 1985).

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich, lebensfähige und fruchtbare transgene Säugetiere, insbesondere ES oder EG-Mäuse, aus *in vitro* genetisch veränderten totipotenten Zellen routinemäßig herzustellen.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können u.a. aus genetisch manipulierten totipotenten Zellen, die z.B. ein spezifisches Gen überexprimieren oder in denen ein spezifisches Gen inaktiviert wurde, transgene Tiere reproduzierbar hergestellt werden, die u.a. für Genfunktionsstudien oder für die Produktion von Proteinen verwendet werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet gegenüber herkömmlichen Methoden zur Herstellung transgener Tiere eine leistungsfähige, schnelle und wirtschaftliche Möglichkeit, mutante Tierföten, insbesondere Mausföten, sowie transgene Stämme direkt aus totipotenten Zellen, in denen die gewünschten genetischen Veränderungen vorgenommen wurden, herzustellen.

Alle drei im Rahmen der vorliegenden Erfindung untersuchten ES-Zelllinien der Bezeichnung D3, R1 und GS1 bildeten nach Injektion in diploide Blastozysten Keimbahn-Chimären aus. Bei Injektion in tetraploide Blastozysten wurden lebende ES-Mäuse aus R1- und GS1-Zellen erhalten. Mit D3-Zellen gelang es nicht, auch nicht mit Zellen einer frühen Passage (Passage 9), nach Injektion von ES-Zellen in tetraploide Blastozysten lebende ES-Mäuse herzustellen. Dies steht im Einklang mit früheren Beobachtungen aus Aggregationsversuchen (Nagy et al, 1990; siehe auch Tab.2) mit diesen Zellen. Die Unfähigkeit von D3-Zellen, lebensfähige ES-Mäuse zu bilden, ist vermutlich nicht darauf zurückzuführen, daß diese Zellen ihr Entwicklungspotential verloren haben; D3-Zellen wurden

bereits häufig in sog. "Gene-Targeting"- Versuchen eingesetzt, wobei nach deren Injektion in diploide Blastozysten eine hohe Chimärismusrate und Keimbahn-Chimären erhalten werden konnten (Urbánek et al., 1994; Wang et al., 1992; Wang et al., 1994; siehe auch Tab.1). Es ist jedoch möglich, daß das Potential von D3-Zellen, zu einigen Zelltypen zu differenzieren, die kritisch für die Anpassung des Fötus an das postnatale Leben sind, aufgrund unbekannter genetischer oder epigenetischer Veränderungen beeinträchtigt ist. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, daß D3-Zellen in der Lage sind Föten zu produzieren, die sich zum normalen Geburtstermin entwickeln, daß jedoch die Neugeborenen nicht in der Lage sind, die Atmung aufrechtzuerhalten, sowie daß sie ein erhöhtes Körpergewicht und Polytaktylie aufweisen und bei der Geburt sterben. Diese Eigenschaften erinnern an die phänotypischen Merkmale von Mäusen, denen das "imprinted" Igf2/Mpr-Gen fehlt (Wang et al., 1994; Lau et al., 1994); es könnte daher sein, daß geprägte ("imprinted") Gene oder Gene, welche das Wachstum der Föten regulieren, für den beobachteten Effekt verantwortlich sind. Während in der Umgebung von Wirtszellen diploider Embryonen fehlerhafte Funktionen der ES-Zellen von den Wirtszellen komplementiert werden dürften, scheint das den D3-Zellen aufgrund ihrer Undifferenziertheit eigene Entwicklungspotential, alle funktionellen Zelltypen bilden zu können, in einer vollständig von ES-Zellen stammenden Umgebung eingeschränkt zu sein. Die Einführung von verschiedenen Wildtyp-ES-Zellen in tetraploide Embryonen, zweckmäßig in Serienversuchen, kann daher als schneller und sicherer Test dienen, um die Eignung von ES-Zellen für die Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung zu überprüfen.

Der genetische Hintergrund der jeweiligen Mausstämme, von denen die verschiedenen ES-Zellen stammen, dürfte ein weiterer Faktor sein, der die Lebensfähigkeit der ES-Mäuse beeinflußt. Alle im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten ES-Zelllinien stammten vom Mausstamm 129 ab: die R1-Zellen stammten von einer Maus-Blastozyste aus einer Kreuzung zwischen den Substämmen 129/Sv und 129/Sv-CP (Nagy et al., 1993) ab; GS1-Zellen stammten von 129/Sv/Ev. D3-Zellen (Doetchmann et al., 1985) und J1-Zellen (Li et al., 1992) stammten aus 129/Sv bzw. 129/terSv. TT2-Zellen, die ebenfalls ES-Mäuse ergaben, stammten von einem hybriden Stamm F1 (C57BL/6 x CBA) (Yagi et al., 1993). Aufgrund der im Rahmen der vorliegenden Erfindung erhaltenen Ergebnisse sowie früheren Arbeiten (Nagy et al., 1993, Ueda et al., 1995) kann nicht ausgeschlossen werden, daß ES-Zelllinien, die von verschiedenen Mausstämmen oder Substämmen abgeleitet sind, unterschiedliche Fähigkeiten zur Bildung lebensfähiger ES-Mäuse aufweisen.

Die Effizienz bei der Herstellung neugeborener ES-Mäuse mittels Injektion von Wildtyp-R1-Zellen in tetraploide Embryonen (14%) war höher als die Herstellung mittels Aggregation (6% im Rahmen der vorliegenden Erfindung bzw. 7% in der von Nagy et al. (1993) beschriebenen Arbeit). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit einem Vergleich zwischen der Methode der Aggregation und der Injektion von ES-Zellen in diploide Embryonen (Wood et al., 1993). Die erfindungsgemäße Verwendung von tetraploiden Blastozysten für die Injektionsmethode ergab, daß einige ausgewählte R1-Zellklone, die länger als 24 Passagen *in vitro* kultiviert worden waren (z.B. R169.2.3 und R-fra3), noch die Fähigkeit aufwiesen, lebensfähige ES-Mäuse zu produzieren. Diese Ergebnisse sind bemerkenswert, insbesondere angesichts von

Resultaten früherer Aggregations-Versuche, in denen Wildtyp-R1-Zellen ihre Fähigkeit, lebensfähige ES-Mäuse zu produzieren, nach Passage 14 verloren (Nagy et al., 1993). Die Gründe, warum die Injektion von ES-Zellen in tetraploide Blastozysten reproduzierbar zur Ausbildung von ES-Mäusen führt, sind nicht vollständig geklärt. Da ES-Zellen ursprünglich aus ICM von Blastozysten gewonnen werden und diesen ICM-Zellen auch sehr ähnlich sind (Beddington und Robertson, 1989), ist es vorstellbar, daß sowohl die räumliche Nähe von ES-Zellen und ICM als auch deren Kompatibilität in der Entwicklung für diesen Effekt verantwortlich sind. Diese Annahme wird darüberhinaus durch die Beobachtung aus Vergleichsversuchen gestützt, daß die Effizienz, chimäre Mäuse zu erzeugen, geringer war, wenn ES-Zellen in diploide Morulae unterhalb der "zona pellucida" eingebracht wurden, als wenn die herkömmliche Blastozysten-Injektionsmethode (Injektion in diploide Blastozysten) verwendet wurde.

Die hohe Effizienz der erfindungsgemäßen Methode macht sie gegenüber den Methoden des Standes der Technik (Aggregation von ES-Zellen mit tetraploiden Blastozysten bzw. Injektion in diploide Blastozysten) überlegen und bietet die zur Zeit einzige Möglichkeit, mutante Mäuse direkt von genetisch veränderten totipotenten Zellen zu erzeugen.

Die Erzeugung von lebensfähigen mutanten Mäusen direkt von genetisch manipulierten totipotenten Zellen hat viele Vorteile. Da die fötalen Gewebe vollständig von totipotenten Zellen abstammen, die genetisch modifizierbar sind, bietet diese Technik einen direkten Weg, um fötale Material reinen ES- bzw. EG-Zell-Ursprungs für zellbiologische, molekularbiologische

oder genetische Studien herzustellen (Forrester et al., 1991; Carmeliet et al., 1996).

ES-Föten reproduzieren die Expressionsmuster von spezifischen Genen, wie z.B. des Pax5-Gens bzw. einem "trapped" Gen, im Vergleich mit Föten, die durch Kreuzungen von heterozygoten mutanten Mäusen, die aus denselben ES-Zellen hervorgegangen sind, verlässlich. Vorteilhafterweise können ES-Föten für Expressionsstudien verwendet werden, weil dadurch eine rasche Produktion von fötalem Material (einige Tage) ermöglicht wird, während die konventionelle Züchtung normalerweise vier bis fünf Monate dauert. Darüberhinaus minimiert das verlässliche und reproduzierbare Expressionsmuster in ES-Föten mögliche Komplikationen in herkömmlichen chimären Geweben, die definitionsgemäß sowohl aus Wildtyp- als auch aus mutierten ES-Zellen bestehen. Daher ist diese Technik für Studien über Genfunktion oder zur Identifikation von neuen Genen, z.B. in "gene-trap" Studien (Skarnes, 1993) nützlich. Es wurde gezeigt, daß mit Hilfe der erfindungsgemäßen Methode (Injektion von ES-Zellen in tetraploide Blastozysten), mutante Mauslinien, z.B. c-fos-Transgene und fra-1-"knock-out"-Mäuse, direkt von mutanten ES-Zellen in effizienter Art und Weise hergestellt werden können. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet die Möglichkeit, aus ES-Zellen oder EG-Zellen, die für die Integration und Expression von Transgenen vorselektiert wurden, transgene Mauslinien zu produzieren. Die Effizienz, Mäuse, die ein spezifisches Gen überexprimieren, herzustellen, wird dadurch - im Vergleich mit der herkömmlichen Injektionsmethode, bei der diploide Blastozysten verwendet werden - signifikant verbessert. Das erfindungsgemäße Verfahren wurde in mehreren Gen-Überexpressions- und Inaktivierungsstudien angewandt.

Darüberhinaus ist es möglich, mit dieser Methode mutante Gewebe zum Studium spezifischer Effekte herzustellen, falls Inaktivierung oder Überexpression zum Tod oder zu beeinträchtigter Gametogenese in heterozygoten Mutanten oder gar in Chimären führen sollte (z.B. siehe Carmeliet et al., 1996).

Letztlich bietet das erfindungsgemäße Verfahren die Möglichkeit, mutante Tierstämme, insbesondere Mausstämme, rasch und wirtschaftlich herzustellen und einen schnellen Zugriff auf mutante Föten und Tiere zu haben, was einen wesentlichen Vorteil für die Forschung auf dem Gebiet der Mausgenetik darstellt.

Außer für die Herstellung transgener Tiere kann das erfindungsgemäße Verfahren für die Herstellung von nicht genetisch veränderten ES-Tieren oder EG-Tieren, die bestimmte erwünschte Eigenschaften aufweisen, verwendet werden. Dazu werden totipotente Zellen eingesetzt, die im Hinblick auf die erwünschten Eigenschaften durch Züchtungsversuche vorselektiert werden, um identische Tiere mit den entsprechenden Eigenschaften zu erhalten.

Figurenübersicht

Fig.1: Herstellung von tetraploiden Embryonen.
Injektion von ES-Zellen in tetraploide
Blastozysten

Fig.2: GPI-Analyse von neugeborenen ES-Mäusen und von
Nachkommen von ES-Mäusen, die von R1-Zellen
abstammen

Fig.3: Vergleich der lacZ-Genexpression in ES-Föten und in Föten, die von heterozygoten Kreuzungen stammen

In den folgenden Beispielen, die die vorliegende Erfindung veranschaulichen, wurden, wenn nicht anders angegeben, die folgenden Materialien und Methoden verwendet:

a) Mäuse: Als Spender diploider Embryonen wurden C57BL/6-Mäuse und als Spender tetraploide Embryonen B6CBAF1-Mäuse (C57BL/6 x CBA) verwendet. Beide Stämme sind homozygot für das Gpi-1^b-Allel am Gpi-1 Locus, das für die Glukosephosphat isomerase (GPI) kodiert.

b) ES-Zellen und Gentransfer: Es wurden folgende in der Literatur beschriebene ES-Zellen verwendet:
D3-Zellen (Doetchmann et al., 1985)
R1-Zellen (Nagy et al., 1993)
J1-Zellen (Li et al., 1992)

GS1-Zellen wurden aus Blastozysten des Substammes 129/Sv/EV isoliert. Dieser Mausstamm wurde aus einer chimären Maus, erhalten nach Keimbahnübertragung von ES-Zellen des Genotyps von AB1, etabliert. AB1-ES-Zellen waren ursprünglich vom Substamm 129/Sv/EV etabliert worden, wie von McMahon und Bradley, 1990, und von Papaioannou, 1993, beschrieben. Zur Isolierung der GS1-Zellen wurde im wesentlichen die von Robertson, 1987, beschriebene Methode verwendet: Blastozysten wurden auf einer 4-Well-Platte auf Feeder-Zellen plattiert, die ICM vermehrte sich nach 5 Tagen Kultur. Die ES-Zell-ähnlichen Klumpen wurden mit einer Pipette zerteilt und auf eine neue Platte mit Feederzellen neu ausplattiert. Die expandierten ES-Zellen wurden

identifiziert und weiter auf ihren Karyotyp und ihre Totipotenz hinsichtlich der Entwicklung untersucht.

Alle ES-Zellen wurden ursprünglich aus der Vermehrung von Blastozysten isoliert, die vom Mausstamm 129, der für das Gpi-1^a-Allel homozygot ist, erhalten wurden. Um die ES-Zellen zu modifizieren, wurden R1-Zellen der Passage 16 mit verschiedenen Konstrukten elektroporiert; G418-resistente Klone wurden ausgewählt und vor der Injektion expandiert. Es wurden die folgenden Konstrukte verwendet: ein c-fos überexprimierender Vektor (Wang et al., 1991); ein sog. "Gene-Trap-Vektor" der Bezeichnung pSAβgeo, der ein lacZ-neo Fusionsgen ohne Promotor enthält und die Eigenschaft hat, in Introns beliebiger Gene integrieren zu können (Friedrich und Soriano, 1991); ein sog. "Gene-Targeting-Vektor", der das Pax5-Gen durch homologe Rekombination in Mäusen unterbricht (Urbánek et al., 1994); sowie ein Gene-Targeting-Vektor, der durch homologe Rekombination das endogene fra-1 Gen ("Fos related antigen 1") unterbricht. (Zur Herstellung des fra-1 Gene-Targeting-Vektors wurden aus einer genomischen Mausbibliothek einige Cosmid-Klone isoliert, die das fra-1 Gen enthalten, und es wurden die Sequenz und die Exon/Intron-Organisation des gesamten Gens bestimmt. Aufgrund dieser Information wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen eine Null-Mutation im fra-1-Gen eingeführt. Ausgehend vom Plasmid pGNA (Le Mouellic et al., 1990; 1992) wurde ein Gene-Targeting-Vektor konstruiert. In diesem waren die essentiellen DNA-Bindungs- und Dimerisierungs(Leucinzipper)-Domänen von fra-1 durch die bakteriellen Gene, kodierend für β-Galaktosidase und Neomycinresistenz, welche in Säugetieren als Reportergen bzw. selektierbarer Marker dienen, ersetzt. Nach der Elektroporation von ES-Zellen wurden G418-

resistente Kolonien entweder mittels Southern Blot oder Färbung auf β -Galaktosidase-Aktivität analysiert, um die Integration der Vektoren zu bestätigen.

c) Gewinnung von Zwei-Zell-Embryonen; Elektrofusion: Zwei-Zell-Embryonen wurden aus weiblichen B6CBAF1-Mäusen am Tag 1.5 post-coitum (p.c.) isoliert und für die Herstellung von tetraploiden Blastozysten verwendet (Fig.1A). Mittels Elektrofusion wurde Tetraploidie der Embryonen herbeigeführt, wobei das von Nagy und Rossant (1993) beschriebene Verfahren modifiziert wurde: Zwei-Zell-Embryonen wurden in einer 0.3 M Mannitollösung 30 sec lang äquilibriert, bevor sie einzeln zwischen zwei Platinelektroden in 0.3M Mannitol angeordnet und einem kurzen Stromstoß bei 95V während 30 μ sec in einem effektiven Feld von 2V unter Verwendung eines Stromstoßgenerators CF-100 (Biochemical Laboratory Service, Budapest) ausgesetzt wurden (Fig.1B). Nach einer Inkubationszeit von 15 min begannen zwei Blastomere zu fusionieren (Fig.1C, offener Pfeil) und allmählich einen Ein-Zell-Embryo zu bilden (Fig.1C, Pfeil).

d) Aggregation von ES-Zellen mit Morulae; Injektion von ES-Zellen in Blastozysten: Für die Aggregation wurden die Morulae entweder aus den Eileitern von trächtigen Mäusen (Tag 2.5 p.c.) isoliert oder aus tetraploiden Ein-Zell-Embryonen erhalten, indem diese 24 bis 40 h nach der Elektrofusion kultiviert wurden. Die Aufarbeitung und Aggregation der ES-Zellen wurde durchgeführt, wie von Nagy et al. (1990) beschrieben. Diploide Blastozysten wurden aus dem Uterus von trächtigen C57BL/6-Mäusen (Tag 3.5 p.c.) isoliert. Um tetraploide Blastozysten zu erhalten, wurden die elektrofusionierten Ein-Zell-Embryonen 48 bis 60 h nach der Fusion kultiviert (M16 Medium bei 37°C in einem

Inkubator mit 95% Luft/5% CO₂; Fig.1D). Wildtyp- oder genmanipulierte ES-Zellen wurden dann nach der von Wang et al. (1991) beschriebenen Methode in diploide bzw. tetrapoide Blastozysten injiziert (Fig.1E, Fig.1F). Während sich die injizierten diploiden Embryonen in der normalen Tragzeit entwickelten und dann natürlich entbunden wurden, wurden die trächtigen Mäuse, die tetraploide Embryonen empfangen hatten, am Tag 18.5 einem Kaiserschnitt unterzogen (Nagy et al., 1990). Lebensfähige Föten, beurteilt aufgrund von Herzschlag und Atmung, wurden von einem Weibchen aufgezogen, das am selben Tag oder am Vortag geworfen hatte. Einige der lebenden Jungen wurden auf GPI-Marker untersucht. Die überlebenden ES-Mäuse wurden weiter mit Wildtyp-C57BL/6-Mäusen gepaart, um sie auf Fruchtbarkeit und Keimbahnvererbung zu testen.

e) GPI-Isoenzym-Analyse: Verschiedene Gewebe von Föten oder erwachsenen Tieren, die von ES-Zellen abstammten, wurden isoliert und in destilliertem Wasser zerkleinert. Die Proben wurden durch drei Gefrier-/Auftauzyklen lysiert und, wie von Bradley (1987) und Wang et al. (1991) beschrieben, nach Proteinextraktion der GPI-Analyse unterworfen. In den chimären Geweben wurde der Anteil der Zellen, die von ES-Zellen oder vom Wirt stammten, aus dem Verhältnis der GPI-1A- bzw. GPI-1B- Isoenzymaktivität, die in einem gekoppelten optischen Assay sichtbar gemacht wurde, geschätzt.

f) β-Galaktosidase-Histochemie: Es wurde die von Sanes et al. (1996) beschriebene Methode in modifizierter Form verwendet, um die β-Galaktosidase-Aktivität in fixierten intakten Embryonen zu bestimmen. Die Embryonen und ihre extra-embryonalen Membranen wurden 5-10 min lang fixiert (100 mM Na-Phosphat, pH 7.4,

5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0.2% Glutaraldehyd), anschließend dreimal gewaschen (100 mM Na-Phosphat, pH 7.4, 2 mM MgCl₂ 0.01% Na-Desoxycholat, 0.02% NP-40) und mit einer histochemischen Reaktionsmischung (100 mM Na-Phosphat, pH 7.4, 2 mM MgCl₂ 0.01% Na-Desoxycholat, 0.02% NP-40, 5mM K-Eisen(III)-Zyanid, 5mM K-Eisen(II)-Zyanid und 1mg/ml X-Gal) gefärbt.

Beispiel 1

Herstellung chimärer Mäuse, die von diploiden Embryonen und Wildtyp-ES-Zellen stammen

Um das Entwicklungspotential verschiedener ES-Zelllinien zu testen, wurden zunächst vier verschiedene Wildtyp-ES-Zelllinien verwendet, um chimäre Mäuse herzustellen, und zwar einerseits durch Aggregation der ES-Zellen mit diploiden Morulae, andererseits durch deren Injektion in diploide Blastozysten. Von allen vier ES-Zelllinien konnte gezeigt werden, daß sie in der Lage sind, nachdem sie in diploide Maus-Embryonen eingebracht wurden, eine hohe Chimärismusrate zu liefern sowie Keimbahnchimären mit großer Häufigkeit zu bilden (siehe Tab.1). Interessanterweise wurde ein hoher Anteil von weiblichen Chimären auch mit R1- und J1-Zellen erhalten, von denen einige die Fellfarbe Agouti des Stammes 129/Sv an ihre Nachkommenschaft vererbten (Tab.1).

Beispiel 2

Herstellung lebensfähiger ES-Mäuse durch Aggregation von ES-Zellen mit tetraploiden Embryonen oder Injektion der Zellen in Blastozysten

Um tetraploide Embryonen herzustellen, erhielten Zweizell-Embryonen einen kurzen Stromstoß, der zur Fusion von ca. 90% der Embryonen führte. Diese Embryonen wurden weiterkultiviert. Es wurden fünf Versuche durchgeführt, in denen sich die Embryonen mit hoher Frequenz zu Morulae (68-95%) und zu Blastozysten (80-98%) entwickelten. Die Morulae wurden für die Aggregation mit ES-Zellen verwendet, die Blastozysten, um in sie ES-Zellen zu injizieren (Fig.1E, Fig.1F). Es wurden alle vier Wildtyp-ES-Zelllinien (D3, R1, J1 und GS1) im Hinblick auf die Herstellung von ES-Mäusen getestet. Aus der Aggregation mit D3-Zellen wurden nach Kaiserschnitt 26 lebende Neugeborene erhalten, von denen jedoch kein einziges überlebte (Tab.2). Ebenso konnten aus J1-Zellen keine lebensfähigen ES-Mäuse erhalten werden (Tab.2). Im Gegensatz dazu ergaben R1-Zellen nach Aggregation mit tetraploiden Morulae ES-Mäuse mit ähnlicher Häufigkeit (siehe Tab.2) wie von Nagy et al., 1993 beschrieben.

Da die Methode der Injektion von ES-Zellen in diploide Blastozysten hinsichtlich Chimärenbildung ähnlich effizient war wie die Aggregationsmethode (siehe auch Wood et al., 1993), wurde als nächstes untersucht, ob ES-Mäuse mittels Injektion von Wildtyp-ES-Zellen in tetraploide Blastozysten erhalten werden können. Bei Verwendung von D3-Zellen aus Passage 9 konnte ein relativ hoher Anteil (28%) von vollentwickelten Föten am Tag 18.5 p.c. (E18.5) mittels Kaiserschnitt erhalten werden (Tab.2); die Neugeborenen konnten jedoch die

Atmung nicht aufrecht erhalten und starben kurz darauf. Interessanterweise wiesen diese Neugeborenen ein höheres Körpergewicht sowie Polydaktylidie auf. Von 36 tetraploiden Blastozysten, die mit R1-Zellen (Passage 14) injiziert worden waren, wurden neun lebensfähige Junge mittels Kaiserschnitt zum Zeitpunkt E18.5 geboren (Tab.2). Fünf davon konnten die Atmung aufrecht erhalten und wurden von einer Ammenmutter aufgezogen. Bedauerlicherweise waren zwei Junge nach 7 Tagen nicht auffindbar und eines starb im Alter von 5 Wochen. Zwei dieser ES-Mäuse überlebten bis zum Erwachsenenalter und zeigten vollständige Keimbahnvererbung (Tab.2). Nach Injektion von GS1-Zellen in 54 tetraploide Blastozysten entwickelten sich 17 Embryonen in der normalen Tragzeit (Tab.2). Sechs Junge wurden mittels Kaiserschnitt geboren und konnten ihre Atmung aufrecht erhalten. Fünf Junge starben innerhalb von 48 h, und eine ES-Maus überlebte bis zum Erwachsenenalter und vererbte das aus ES-Zellen stammende genetische Material an die Nachkommenschaft (Tab.2).

Beispiel 3

Herstellung von ES-Mäusen mit genetisch modifizierten ES-Zellklonen

Nachdem aus tetraploiden Blastozysten, in die R1- oder GS1- Wildtyp-Zellen injiziert worden waren, lebensfähige ES-Mäuse entstanden waren, wurde als nächstes untersucht, ob die erfindungsgemäße Methode auch geeignet ist, mutante ES-Mäuse aus genetisch manipulierten ES-Zellen zu liefern. Als erstes wurden R1-Zellen mit dem *c-fos*-Expressionsvektor elektroporiert und zwei G418-resistente Klone der Bezeichnung R-169.2.3 und R-169.2.5 für die Injektion in tetraploide Blastozysten verwendet (die R1-Klone wurden vor ihrer

Infektion in Blastozysten über mehr als 24 Passagen kultiviert). Klon R-169.2.5 wurde in insgesamt 103 Blastozysten injiziert; es wurden zwölf Neugeborene mittels Kaiserschnitt erhalten. Drei von ihnen hielten die Atmung aufrecht, starben aber nach 48 h. Klon R-169.2.3 ergab eine höhere Zahl von überlebenden Neugeborenen; 23 Junge waren nach dem Kaiserschnitt lebensfähig, zwölf davon wurden von einer Ammenmutter aufgezogen (Tab.2). Leider starben sieben Neugeborene in den ersten drei Tagen aufgrund ungenügender Pflege durch die Ammenmutter. Zwei weitere Mäuse gingen während der Entwöhnungsphase verloren. Drei Mäuse überlebten bis zum Erwachsenenalter. Nachdem mittels Southern Blot Analyse bestätigt worden war, daß das Transgen auf die Nachkommen vererbt wurde, wurden zwei transgene Linien etabliert.

In einem weiteren Versuch wurde ein R1-Klon der Bezeichnung R-fra 3 (*fra-1 +/-*) aus Passage 24 verwendet, in dem ein Allel des *fra-1*-Gens durch homologe Rekombination unterbrochen ist. R-fra 3-Zellen wurden in 48 tetraploide Blastozysten injiziert; mittels Kaiserschnitt wurden acht lebende Junge erhalten. Vier von fünf von einer Ammenmutter aufgezogene Neugeborenen erreichten das Erwachsenenalter, von drei davon konnte bestätigt werden, daß sie das mutierte Allel (*fra-1 +/-*) an die Nachkommen vererbten (Tab.2). Die weibliche chimäre Maus war steril, was im Gegensatz zu den mit Wildtyp-R1-Zellen erhaltenen Ergebnissen stand, wo mit diesen Zellen und diploiden Embryonen Chimären-Weibchen erhalten wurden, die Keimbahn-Nachkommen hervorbringen konnten.

Beispiel 4

GPI-Analyse in Geweben von ES-Föten und ES-Mäusen

Um zu bestätigen, daß die nach den obigen Beispielen erhaltenen Föten und erwachsenen Mäuse tatsächlich ausschließlich von ES-Zellen abstammen, wurde eine GPI-Analyse durchgeführt, mit der der Beitrag der ES-Zellen zur Gewebsbildung bestimmt werden kann. Aus den Versuchen, in denen eine Aggregation vorgenommen worden war, zeigten alle elf Föten aus D3-Zellen, einer aus R1-Zellen und einer aus J1-Zellen in allen untersuchten Geweben eine 100%ige Abstammung von ES-Zellen (Tab.3). Ein von R1-Zellen abgeleiteter Fötus wies einen kleinen Gewebsanteil (ca. 10%) im Herzen auf, der von Wirtszellen abstammte, wobei die anderen untersuchten Gewebe ausschließlich von ES-Zellen abstammten (Fig.2A, Tab.3). Gleichermassen stammten die meisten ES-Föten und alle R1- und GS1-abgeleiteten erwachsenen ES-Mäuse, die mittels Injektion der Zellen in tetraploide Blastozysten hergestellt worden waren, ausschließlich von ES-Zellen ab, mit der Ausnahme von zwei der D3-abgeleiteten Föten (E18.5), die in Herz, Lunge und Leber einen Beitrag von Wirtszellen im Ausmaß von 10 bis 50% aufwiesen. Bemerkenswerterweise zeigten vier von R1-Zellen abstammende Föten bereits im frühen Stadium (Tag 13.5 p.c.) ausschließlich den ES-spezifische GPI-1A Marker (Tab.3). Zusätzlich wurden die Nachkommen der von R1 abstammenden ES-Mäuse mittels GPI-Analyse untersucht, wobei gezeigt werden konnte, daß sie von ES-Zellen abstammen.

ES-Föten und erwachsene Mäuse, die durch Injektion von genetisch modifizierten R1-Zellen in tetraploide Blastozysten hergestellt worden waren, wurden ebenfalls mittels GPI-Analyse untersucht. Von Geweben von zwei

neugeborenen Jungen (E18.5), die vom ES-Klon R-169.2.5 abgeleitet waren, zeigte sich, daß sie vollständig von ES-Zellen abstammten. Die GPI-Analyse von drei Tage alten Jungen (abgeleitet von D3-Zellen) und erwachsenen Mäusen, die mit R1-Zellen hergestellt worden waren, die entweder ein *c-fos*-Transgen überexprimierten (R-169.2.3) oder ein inaktiviertes Allel von *fra-1* (R-*fra* 3) aufwiesen, zeigte in allen untersuchten Geweben, daß diese zu 100% von ES-Zellen abstammten (Tab.3). Des weiteren wurden an den Nachkommen dieser ES-Mäuse GPI- und Southern Blot-Analysen durchgeführt. Dabei wurde bestätigt, daß nur der GPI-1A-Marker in allen Nachkommen vorhanden war; einige erbten auch entweder das Transgen (*c-fos*) oder das unterbrochene Allel *fra-1*. Fig.2A zeigt die GPI-Analyse von neugeborenen ES-Mäusen, die von R1-Zellen stammen. Alle Gewebe, außer Plazenta und Herz, enthielten nur den GPI-1A-Marker, was auf eine 100%ige Abstammung von ES-Zellen hinweist. Fig.2B zeigt die GPI-Analyse der Nachkommenschaft einer ES-Maus: Das Blut von vier Jungen einer erwachsenen ES-Maus enthielt ausschließlich das GPI-1A-Isoenzym, was die ES-Abstammung der Nachkommenschaft bestätigt.

Beispiel 5

Vergleich der Genexpressionsmuster von ES-Zell-Embryonen und Keimbahn-Embryonen

Um die Eignung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von ES-Mäusen für die Untersuchung von Genexpression und mutanten Phänotypen zu prüfen, wurde untersucht, wann und wo spezifische Gene in ES-Zell-Embryonen und in Keimbahn-Embryonen exprimiert wurden. Für diese Untersuchung wurden zwei genetisch manipulierte ES-Zellklone, die das *lacZ*-Reportergen enthielten, ausgewählt, wobei einer zu einem sehr

beschränkten lacZ-Expressionsmuster führte (*Pax5 +/-* ES-Klon D3-15; Urbánek et al., 1994); während der andere eine ausgedehnte β -Galaktosidase-Färbung ergab (vgl. unten). Fig.3 zeigt den Vergleich der lacZ-Genexpression in ES-Föten (Fig.3A,C) mit der in Föten, die aus heterozygoten Kreuzungen (Fig.3B,D) stammten. E9.5-Embryonen, erhalten von tetraploiden Blastozysten, die mit dem Klon D3-15 injiziert worden waren, zeigten eine spezifische Expression des lacZ-Gens an der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn (Fig.3A, Pfeil). Dieses Färbemuster war identisch mit dem von Embryonen, die aus heterozygoten Kreuzungen erhalten wurden (Fig.3B; siehe auch Urbánek et al., 1994). Der zweite untersuchte ES-Klon war ein R1-Klon der Bezeichnung R- β geo3, der aus einem Gene-Trap-Experiment erhalten wurde. R- β geo3-Zellen wurden in diploide und tetraploide Blastozysten injiziert. Die injizierten diploiden Embryonen ergaben fruchtbare Chimären, einige von ihnen vererbten das lacZ-Transgen an ihre Nachkommen. Es dauerte ca. vier bis fünf Monate, eine solche transgene Mauslinie zu etablieren und Embryonen aus heterozygoten Kreuzungen verfügbar zu haben. Embryonen, erhalten mittels Injektion von R- β geo3-Zellen in tetraploide Blastozysten, wurden am Tag 8.5 isoliert und auf β -Galaktosidase-Aktivität gefärbt. Im gesamten eigentlichen Embryo, in Amnionmembran (Fig.3C, offener Pfeil) und Allantois wurde eine intensive Färbung nachgewiesen, nicht jedoch im Dottersack (Fig.3C, Pfeil). Dieses Färbemuster war identisch mit dem Färbemuster in heterozygoten Embryonen, die nach heterozygoter Kreuzung erhalten worden waren (Fig.3D). Diese Ergebnisse zeigen, daß das Expressionsmuster des Transgens in ES-Mäusen über Keimbahnvererbung zuverlässig erhalten bleibt.

Tab. 1. Chimäre Mäuse, hergestellt aus diploiden Embryonen, die mit Wildtyp-ES-Zellen aggregiert oder injiziert wurden

Zelllinien	Anzahl der transferierten Embryonen	Anzahl der geborenen Mäuse	Chimären Anzahl M/F	Chimärismus- rate (Bereich)	Keimplinie/ getestet
Aggregation:	D3	15	3	2/0	2M=90-95% 1/1
Injektion:					
D3	69	47	31	30/1 26M=95-100% 4M=80-90% 1F=90%	22/24 3/4 0/1
R1	24	14	12	7/5 7M=95-100% 5F=95-100%	5/5 3/4
J1	60	32	22	6/16 6M=95-100% 9F=95-100% 2F=80-90% 5F=10-50%	6/6 3/8 1/2 2/5
GS1	15	4	4	4/0 4M=95-100%	4/4

M: männliche Tiere; F: weibliche Tiere.

Tab. 2. ES-Mäuse, hergestellt aus tetraploiden Embryonen, die mit modifizierten ES-Zellen aggregiert oder injiziert wurden

ES-Klone	Anzahl der Passagen	Anzahl der transferierten Embryonen	lebende Junge bei Kaiserchmitt		Anzahl der überlebenden Jungen (Anteil in %)	erwachsene ES-Mäuse	Keimbahn/ getestet
			(Anteil in %)	(Anteil in %)			
Aggregation:							
D3	p9	159	26 (16%)	0			
J1	p11	37	1 (3%)	0			
R1	p14	88	14 (16%)	5 (6%)			
					4	4/0	2/2
Injektion:							
D3	p9	69	19 (28%)	0			
R1	p14	36	9 (25%)	5 (14%)			
GS1	p8	54	17 (31%)	6 (11%)			
					2	2/0	2/2
R-169.2.3	p24	80	23 (29%)	12 (15%)			
R-fra 3	p24	48	8 (17%)	5 (10%)			
					1	1/0	1/1
					3	2/1	2/3
					4	3/1	3/4

M: männliche Tiere; F: weibliche Tiere.

Tab. 3. Glukosephosphatisomerase (GPI)-Analyse von ES-Mäusen.

ES-Mäuse	Alter	Anzahl der Mäuse	ES-Zell-Beitrag (%)						Blut Extremitäten
			Leber	Lunge	Herz	Darm	Gehirn	Haut	
Aggregation:									
D3	E16.5	3	100	-	-	-	100	-	-
	E18.5	8	100	-	-	-	100	-	-
R1	E18.5	1	100	100	100	-	100	100	100
J1	E18.5	1	100	100	90	100	-	100	100
Infektion:									
D3	E18.5	11	100	100	100	-	100	-	-
		1	70	80	90	-	100	-	-
R1	E13.5	4	50	50	60	-	100	-	-
	E18.5	4	100	100	100	-	100	-	-
erwachsen									
E18.5	2	100	100	100	100	-	100	-	-
GS1	erwachsen	8	100	100	100	100	-	100	-
MTC-fosLTR	erwachsen	1	100	100	100	100	-	100	-
R-169.2.3	P3	1	100	100	-	100	100	100	-
	erwachsen	3	100	100	100	100	-	100	-
<i>fra-1/-R-fra3</i>									
	erwachsen	1	100	100	100	100	-	100	100
									-

E13.5, E16.5 bzw E18.5; 13.5, 16.5 bzw. 18.5 Tage nach Beginn der Schwangerschaft; P3; 3 Tage nach Geburt.

LITERATUR

- Beddington, R. S. P., & Robertson, E. J. (1989) *Development* 105, 733-737.
- Bradley, A. (1987) in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A practical approach*, ed. Robertson, E. J. (IRL Press, Oxford Washington DC), 113-151.
- Bradley, A. und Robertson, E. J., 1968, in *Manipulating the mouse embryo, A Laboratory Manual*. eds. Hogan, R., Constantini, F. und Lacy, E. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 188-195
- Bronson, S. K., & Smithies, O. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 27155-27158.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Keickens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., & Nagy, A. (1996) *Nature* 380, 435-439.
- Chambers, C. A., Kang, J., Pawling, J., Huber, B., Hozumi, N., & Nagy, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1138-1142.
- Doetchmann, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt W., & Kemler, R. (1985) *J. Embryol. Exp. Morph.* 87, 27-45.
- Donovan, P.J., et al., 1997, *Transgenic Animals, Generation and Use*, Editor: L.M:Houdebine, pp 179-187, Harwood Academic Publishers.
- Forrester, L. M., Bernstein, A., Rossant, J., & Nagy, A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7514-7517.
- Friedrich, G., & Soriano, P. (1991) *Genes & Dev.* 5, 1513-1523
- Gardner, 1968, *Nature* 220, 596-597

- Hilberg, F. & Wagner, E.F. (1992) *Oncogene* 7, 2371-2380
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. & Lacy, E. (1994) in *Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory manual*, eds. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. & Lacy, E. (Cold Spring Harbor Laboratory Press) pp. 253-290)
- James, R. M., & West, J. D. (1994) *Hum. Genet.* 93, 603-604.
- James, R. M., Kaufman, M. H., Webb, S., & West, J. D. (1992) *Genet. Res. Camb.* 60, 185-194.
- James, R. M., Klerkx, A. H. E. M., Keighren, M., Flockhart, J. H., & West J. D. (1995) *Dev. Biol.* 167, 213-226.
- Kaufman, M. H., & Webb, S. (1990) *Development* 110, 1121-1132.
- Kubiak, J. Z., & Tarkowski, A. K. (1985) *Exp. Cell Res.* 157, 561-566.
- Lau, M. M. H., Stewart, C. E. H., Liu, Z., Bhartt, H., Rotwein, P., & Stewart, C. L. (1994) *Genes & Dev.* 8, 2953-2963.
- Le Mouellic, H., Lallemand, Y. und Brulet, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4712-4716.
- Le Mouellic, H., Lallemand, Y. und Brulet, P. (1992) *Cell* 69, 251-264.
- Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992) *Cell* 69, 915-926.
- McMahon, A. P. und Bradley, A., 1990, *Cell* 62, 1073-1085
- Nagy, A., & Rossant, J. (1993) in *Gene Targeting: A practical approach*, ed, Joyner,A. L. (IRL Press, Oxford New York Tokyo), pp. 147-180.
- Nagy, A., Góczá, E., Diaz, E. M., Prideaux, V. R., Iványi, E., Markkula, M., & Rossant, J. (1990) *Development* 110, 815-821.

- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., & Roder, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8424-8428.
- Papaioannou, V. und Johnson, R., 1993, in *Gene Targeting: A practical approach*, ed. Joyner, A. L. (IRL Press, Oxford, New York, Tokyo) 147-180
- Ramirez-Solis, R., Davis A. C., & Bradley, A. (1993) *Methods Enzymol.* **225**, 855-878.
- Robertson, E. J. (1987) in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A practical approach*, ed. Robertson, E. J. (IRL Press, Oxford Washington DC), pp. 71-112.
- Sanes J. R., Rubenstein J. L. R., & Nicolas, J.-F., 1986, *EMBO J.* **5**, 3133-3142.
- Skarnes, W. C. (1993) *Current Opinion in Biotech.* **4**, 684-689.
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., & Rodgers, D. (1988) *Nature* **336**, 688-690.
- Stewart, C.L., Vanek, M. & Wagner, E.F. (1985) *EMBO Journal* **4**, 3701-3709.
- Ueda, O., Jishage, K., Kamada, N., Uchida, S., & Suzuki, H. (1995) *Jikken-Dobutsu* **44**, 205-210.
- Urbánek, P., Wang, Z.-Q., Fetka, I., Wagner, E. F., & Busslinger, M. (1994) *Cell* **79**, 901-912.
- Wagner, E. F., Wang, Z.-Q., Grigoriadis, A. E., Möhle-Steinlein, U., Aguzzi, A., & Risau, W. (1991) in *Origins of Human Cancer: A Comprehensive Review*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 815-823.
- Wagner, E.F. & Keller, G. (1992) in *Development, The Molecular Genetic Approach*, (Springer, Heidelberg), pp. 440-458.
- Wang, Z.-Q., Fung, M. R., Barlow, D. P., & Wagner, E. F. (1994) *Nature* **372**, 464-467.
- Wang, Z.-Q., Grigoriadis, A. E., Möhle-Steinlein, U., & Wagner, E. F. (1991) *EMBO J.* **10**, 2437-2450.

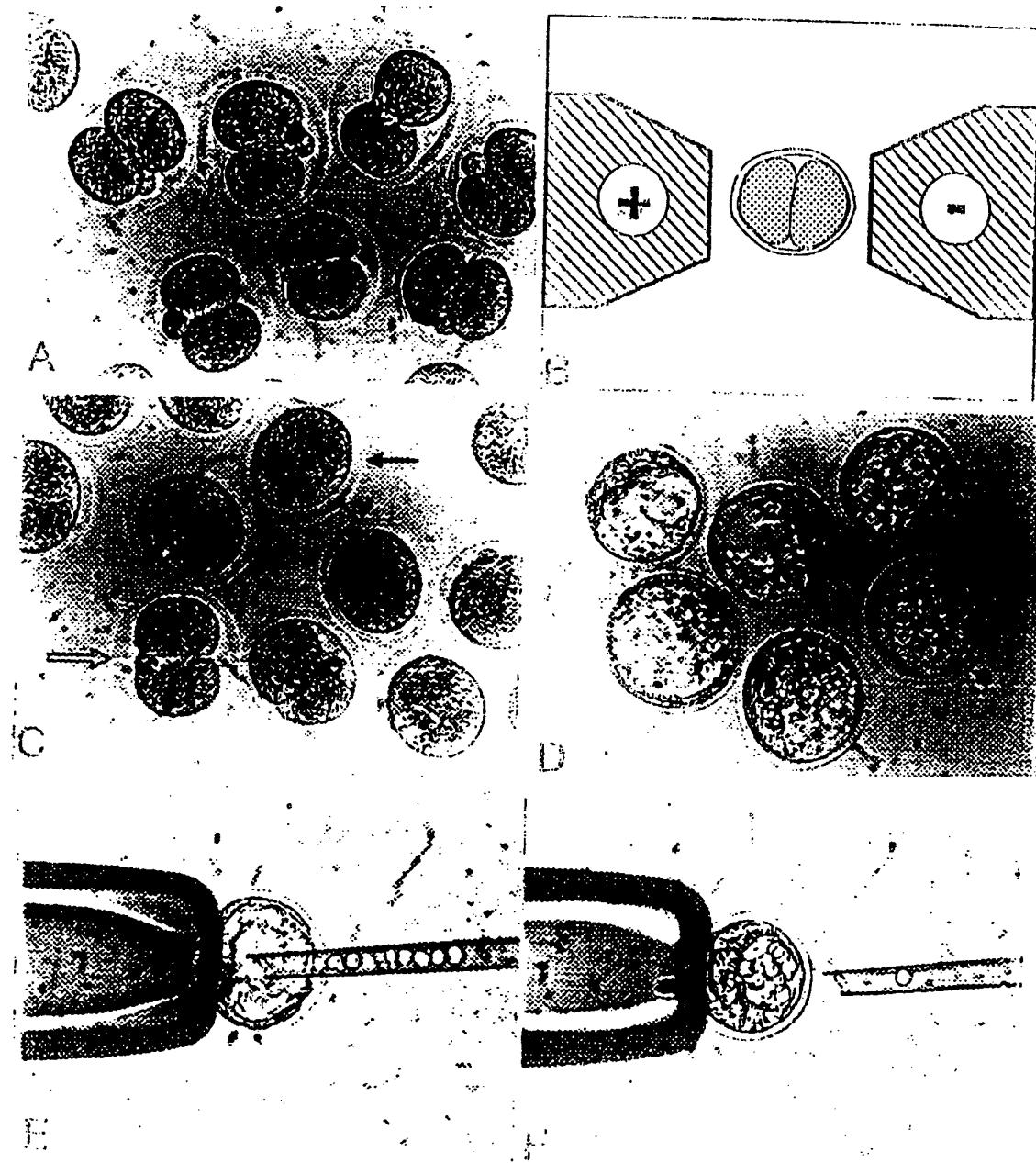
- Wang, Z.-Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Möhle-Steinlein, U., Rüther, U. & Wagner, E. F. (1992) *Nature* 360, 741-744.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., & Gough, N. M. (1988) *Nature* 336, 684-687.
- Wood, S. A., Allen, N. D., Rossant, J., Auerbach, A., & Nagy, A. (1993) *Nature* 365, 87-89.
- Wurst, W. & Joyner, A. L. (1993) in *Gene Targeting: A practical approach*, ed. Joyner, A. L. (IRL Press, Oxford New York Tokyo), pp. 147-180.
- Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y., & Aizawa, S. (1993) *Anal. Biochem.* 214, 70-76.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Säugetieren, die von totipotenten Zellen abgeleitet sind, mit definierten genetischen Eigenschaften, insbesondere transgenen Säugetieren, bei dem totipotente Zellen derselben Säugetierspezies in Blastozysten eingeführt werden und der erhaltene Embryo in eine Ammenmutter transferiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß totipotente Zellen mit definierten genetischen Eigenschaften in tetraploide Blastozysten eingeführt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Säugetiere Mäuse sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Blastozysten verwendet werden, die mittels Elektrofusion von Zwei-Zell-Embryonen und anschließender Züchtung erhalten wurden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die totipotenten Zellen embryonale Stammzellen sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die totipotenten Zellen embryonale Keimzellen sind.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die totipotenten Zellen mittels Mikroinjektion in tetraploide Blastozysten eingeführt werden.

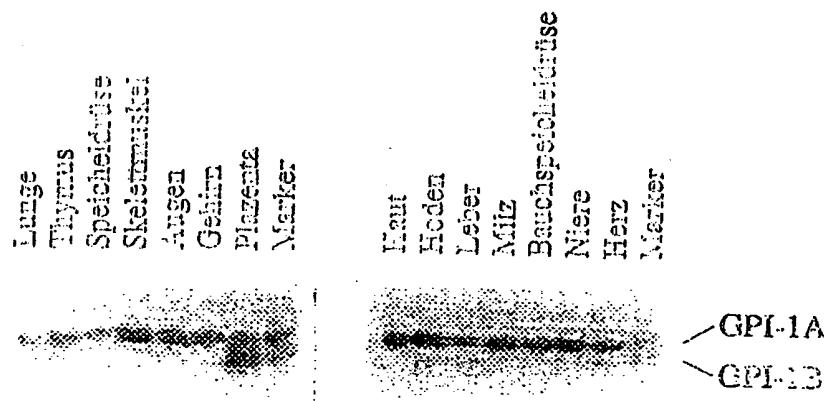
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß genetisch manipulierte totipotente Zellen verwendet werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die genetisch manipulierten totipotenten Zellen durch Einführung von Plasmiden, die die gewünschte genetische Veränderung tragen, erhalten wurden.

1/3
Fig. 1

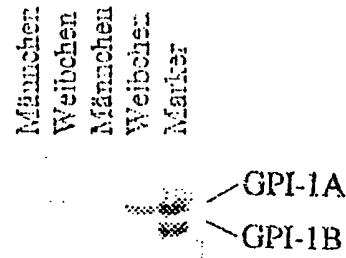


2/3
Fig. 2

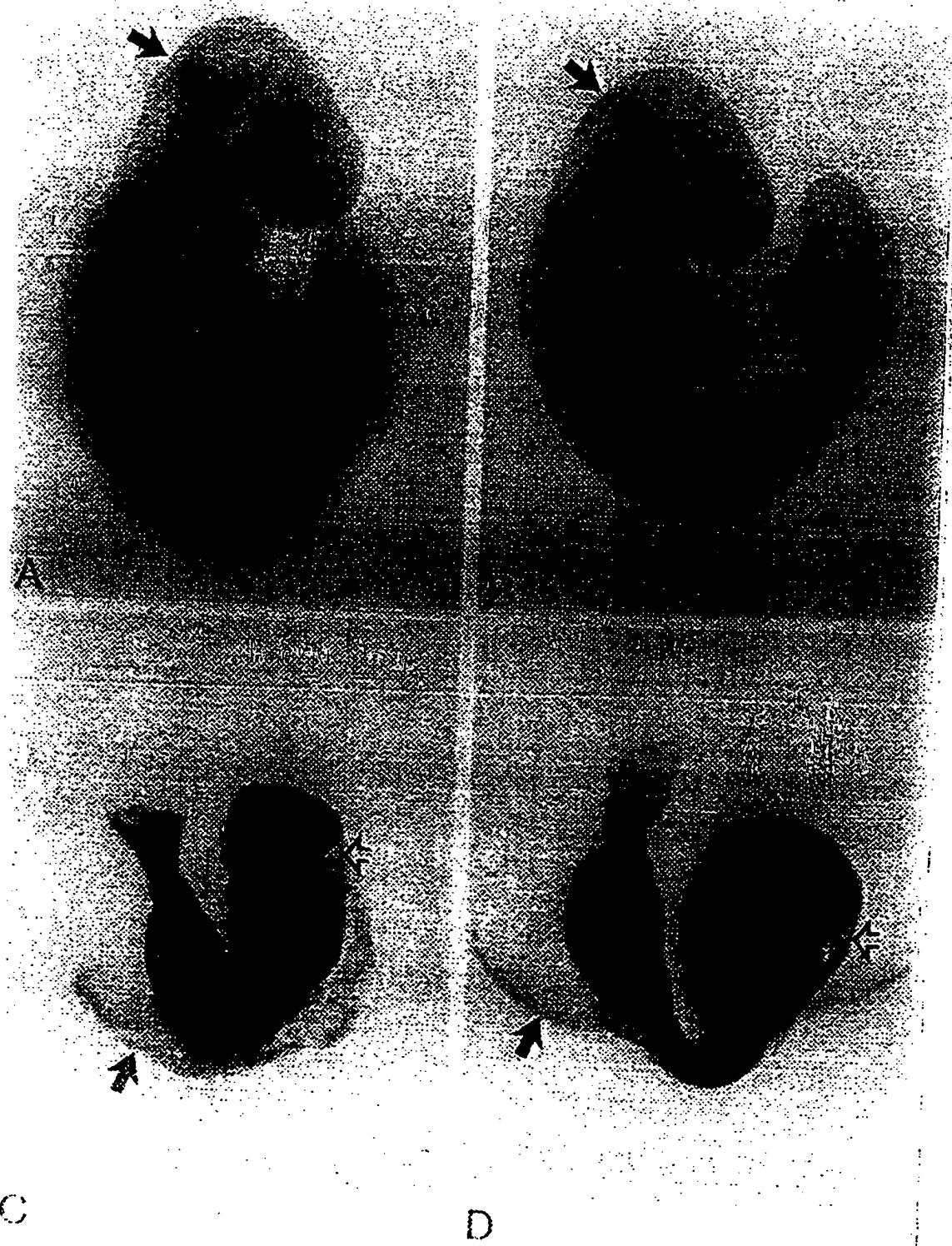
A. Neugeborene



B. Erwachsene



3/3
Fig. 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/04352

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/00 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGY, A. & ROSSANT, J.: "Production of completely ES cell-derived fetuses" 1993, IN JOYNER, A.L. (ED.) GENE TARGETING: A PRACTICAL APPROACH, IRL PRESS OXFORD XP002049677 cited in the application see page 147 - page 180 ---	1-6
Y	UEDA, O. ET AL.: "Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos" EXPERIMENTAL ANIMALS, vol. 44, no. 3, July 1995, pages 205-210, XP002050187 cited in the application see the whole document ---	7,8
X	UEDA, O. ET AL.: "Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos" EXPERIMENTAL ANIMALS, vol. 44, no. 3, July 1995, pages 205-210, XP002050187 cited in the application see the whole document ---	1,2,4
Y	---	7,8

-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 December 1997

Date of mailing of the international search report

14/01/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP 97/04352

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGY, A. ET AL.: "Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse" DEVELOPMENT, vol. 110, no. 3, November 1990, pages 815-821, XP002049672 cited in the application see the whole document ---	1-4,6
Y	EVERETT C.A. & : "The influence of ploidy on the distribution of cell in chimeric mouse blastocysts" ZYGOTE, vol. 4, no. 1, February 1996, pages 59-66, XP002049673 see the whole document ---	7,8
X	JAMES, R.M. ET AL.: "Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimaeras" DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 167, no. 1, 1995, pages 213-226, XP002049674 cited in the application see the whole document ---	1,2
Y	WANG, Z. Q. ET AL.: "Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection" MECHANISMS OF DEVELOPMENT, vol. 62, no. 2, 1997, pages 137-145, XP002049675 see the whole document ---	7,8
P,X	PRATHER, R.S. ET AL.: "Characterization of DNA synthesis during the 2-cell stage and the production of tetraploid chimeric pig embryos" MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, vol. 45, no. 1, September 1996, pages 38-42, XP002049676 see the whole document ---	1-8
P,X		1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 97/04352

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/00 A01K67/027

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A01K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie:	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NAGY, A. & ROSSANT, J.: "Production of completely ES cell-derived fetuses" 1993, IN JOYNER, A.L. (ED.) GENE TARGETING: A PRACTICAL APPROACH, IRL PRESS OXFORD XP002049677 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 147 - Seite 180 ---	1-6
Y	UEDA, O. ET AL.: "Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos" EXPERIMENTAL ANIMALS, Bd. 44, Nr. 3, Juli 1995, Seiten 205-210, XP002050187 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	7,8
X	UEDA, O. ET AL.: "Production of mice entirely derived from embryonic stem (ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos" EXPERIMENTAL ANIMALS, Bd. 44, Nr. 3, Juli 1995, Seiten 205-210, XP002050187 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2,4
Y	---	7,8
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die des Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

15. Dezember 1997

14/01/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Chambonnet, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04352

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NAGY, A. ET AL.: "Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse" DEVELOPMENT, Bd. 110, Nr. 3, November 1990, Seiten 815-821, XP002049672 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----	1-4,6
Y		7,8
X	EVERETT C.A. & : "The influence of ploidy on the distribution of cell in chimeric mouse blastocysts" ZYGOTE, Bd. 4, Nr. 1, Februar 1996, Seiten 59-66, XP002049673 siehe das ganze Dokument ----	1,2
Y		7,8
A	JAMES, R.M. ET AL.: "Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimaeras" DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Bd. 167, Nr. 1, 1995, Seiten 213-226, XP002049674 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----	1
P, X	WANG, Z. Q. ET AL.: "Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection" MECHANISMS OF DEVELOPMENT, Bd. 62, Nr. 2, 1997, Seiten 137-145, XP002049675 siehe das ganze Dokument ----	1-8
P, X	PRATHER, R.S. ET AL.: "Characterization of DNA synthesis during the 2-cell stage and the production of tetraploid chimeric pig embryos" MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, Bd. 45, Nr. 1, September 1996, Seiten 38-42, XP002049676 siehe das ganze Dokument -----	1